



ЛАЛ-ТЕСТ, ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

ЛАЛ-тест для определения пирогенности лекарственных препаратов является активно развивающимся в настоящее время способом контроля качества лекарственных средств. Он может быть использован и в некоторых других областях, где необходимо быстрое обнаружение грамотрицательных бактерий или их эндотоксинов. В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (липополисахаридами, ЛПС). В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина.

Реакция лизата амебоцитов с эндотоксином была открыта в США в 1964 году, где и был налажен выпуск первых коммерческих препаратов. Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах вида *Limulus polyphemus*, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амебоцитов *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*), сокращенно ЛАЛ-реактив и, соответственно, ЛАЛ-тест.

Limulus
Amebocyte
Lysate

- LAL-Reagent
- LAL-Test

Лизат
Амебоцитов
Limulus

- LAL-Reagent
- LAL-Test

ЛАЛ-тест считается сегодня наиболее надежным и перспективным способом проверки потенциальной пирогенности лекарственных средств. Преимущества этого теста: высокая чувствительность, простота выполнения, надежность, воспроизводимость, возможность получения количественного ответа. К несомненным преимуществам ЛАЛ-теста относится возможность анализировать в короткий срок большое число образцов. При массовом использовании ЛАЛ-тест, безусловно, дешевле теста на кроликах. Кроме того, этот метод дает возможность проводить поэтапный контроль содержания эндотоксинов в процессе производства инъекционных препаратов.

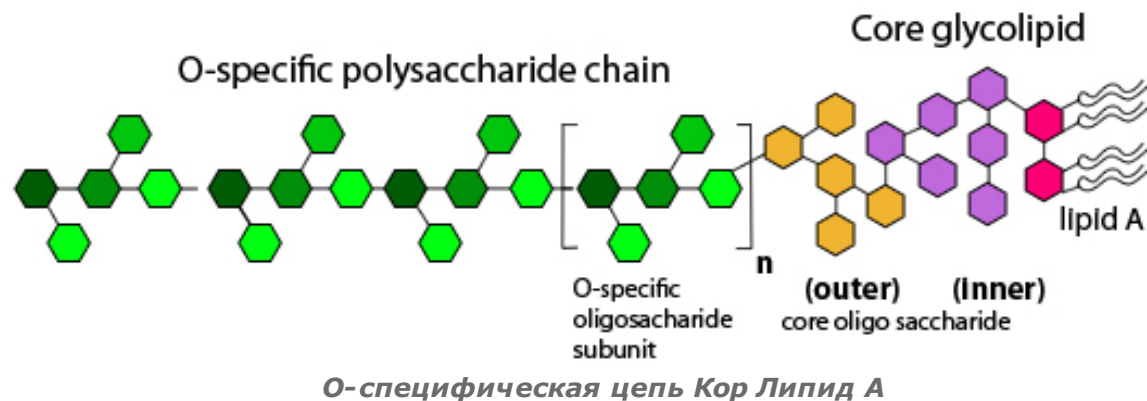
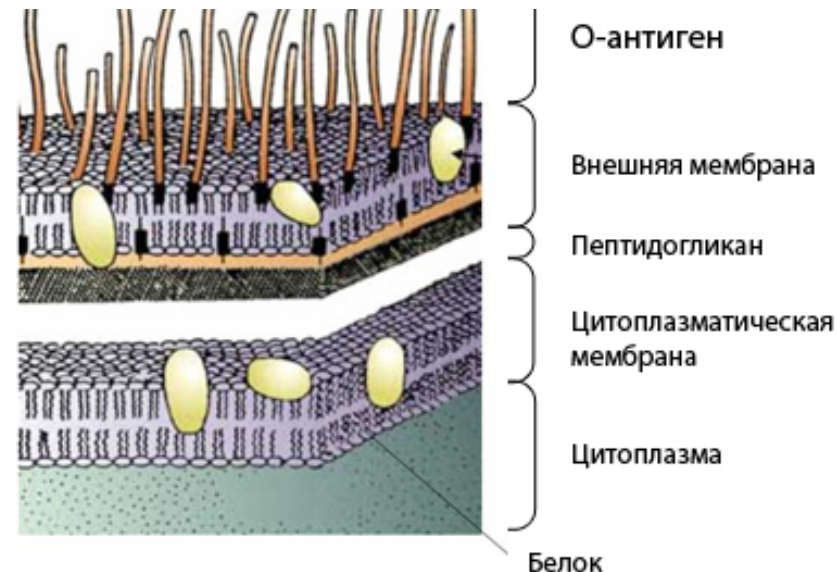
Пирогены и эндотоксины

Термин «пироген» происходит от греческого «pyreto» – лихорадка. Пирогенами называют вещества, способные вызывать повышение температуры тела. Пирогенную реакцию способны вызывать вещества



самой различной природы и разного происхождения. К пирогенам можно отнести грамотрицательные бактерии и их токсины, грамположительные бактерии и их токсины, вирусы и продукты их жизнедеятельности, а также стероиды и пр. В области контроля качества инъекционных лекарственных средств практическое значение имеют *бактериальные эндотоксины*, которые являются фрагментами внешней стенки грамотрицательных бактерий.

Грамотрицательные бактерии обладают двуслойной клеточной стенкой, которая окружает цитоплазматическую мембрану. Первый слой - очень тонкая (толщиной 1 нм) нелипидная мембрана, состоящая из пептидогликана. Его называют также гликопептидом или мукопептидом. Это сложный матрикс, содержащий полисахаридные цепи, связанные друг с другом поперечными шивками из коротких пептидных цепей. Второй слой клеточной стенки - липидная мембрана толщиной 7,5 нм. Именно на этой внешней мембране и расположены эндотоксины (липополисахариды). Молекулы эндотоксина обеспечивают структурную целостность, отвечают за многие физиологические функции, в том числе определяют патогенные и антигенные свойства бактерий. Структурно молекула эндотоксина делится на три части - *Липид А*, *Кор* и *О-специфическую цепь*.



Липид А состоит из дисахарида, фосфата и жирных кислот. Жирные кислоты, входящие в состав Липида А, могут быть насыщенными и ненасыщенными. Наиболее часто в состав Липида А входят кислоты: пальмитиновая, лауриновая, глутаминовая, меристиновая. Участок Липида А является наиболее константным участком молекулы ЛПС, и его строение схоже у многих бактерий.

О-специфическая цепь липополисахаридов построена из повторяющихся олигосахаридов. Наиболее распространенными сахарами, входящими в состав О-специфической цепи, являются глюкоза, галактоза, рамноза. Этот участок молекулы придает ей гидрофильные свойства, благодаря которым ЛПС хорошо растворимы в воде. Полисахаридная часть является наиболее вариательной частью молекулы ЛПС. Часто этот фрагмент молекулы называют О-антигеном, так как именно он отвечает за антигенную активность грамотрицательных бактерий.

Кор - центральная часть молекулы, связывающая О-антиген с Липидом А. Формально структура кора подразделяется на внешнюю и внутреннюю части. В состав внутренней части кора обычно

входят остатки L-глицеро-О-манногептозы и 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО). КДО содержит 8 атомов углерода и в природе практически нигде больше не встречается.

Кроме липополисахаридов в состав внешней стенки грамотрицательных бактерий входят и белки (внешняя мембрана на $\frac{3}{4}$ состоит из ЛПС, и только $\frac{1}{4}$ приходится на белковые компоненты). Эти белки вместе с ЛПС образуют белково-липополисахаридные комплексы разного размера и молекулярной массы. Именно эти комплексы и называются **бактериальными эндотоксинами**. Очищенные препараты, которые используются в качестве стандартов, лишены пептидных фрагментов и представляют собой чистый препарат липополисахарида. Тем не менее, термин «бактериальные эндотоксины» применяется с равным успехом и к естественным эндотоксинам, оказавшимся в растворе в результате разрушения бактерий, и к чистым препаратам ЛПС.

На внешней стенке одной грамотрицательной бактерии может содержаться до 3,5 млн. молекул ЛПС. После ее гибели все они оказываются в растворе. Эндотоксины грамотрицательных бактерий остаются биологически активными молекулами и после гибели бактерий. Молекула эндотоксина температуростабильна и легко выдерживает цикл стерилизации в автоклаве. Малые размеры молекул эндотоксинов позволяют им легко проходить через мембраны, используемые для стерилизации растворов (0,22 мкм). Поэтому эндотоксины могут присутствовать в готовых лекарственных формах, даже произведенных в асептических условиях и прошедших финишную стерилизацию.

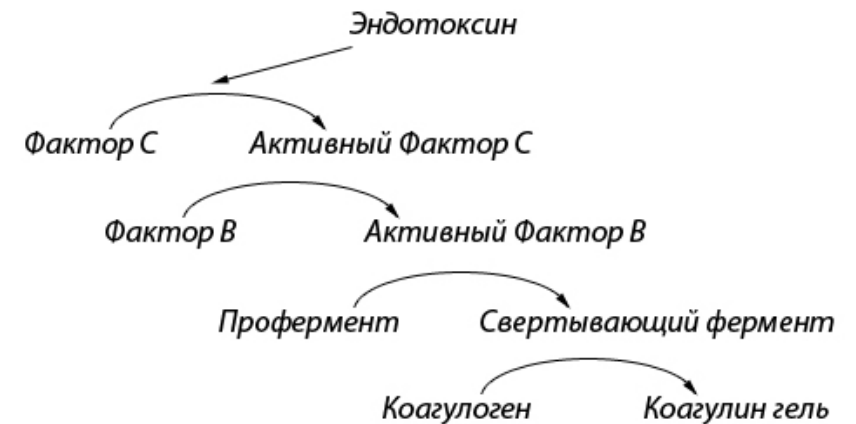
Бактериальные эндотоксины являются исключительно активными (сильными) пирогенами. Для развития лихорадочного приступа достаточно присутствия бактериальных эндотоксинов в инфузионном растворе в концентрации 1 нг/мл (около 10 ЕЭ/мл). Другие пирогены менее активны, и для развития пирогенного ответа их концентрация должна быть в 100-1000 раз больше. Обычно термины «пирогены» и «эндотоксины» употребляются как синонимы и, хотя не все пирогены являются эндотоксинами, наиболее значимыми являются именно эндотоксины грамотрицательных бактерий.

Природа реакции

По современным представлениям в лизате амебоцитов находятся, как минимум, три фермента и белок-субстрат. Ферменты находятся в форме предшественников, первый из них, Фактор С, способен специфически связываться с эндотоксинами. Он переходит в активную форму: активный Фактор С. Активный Фактор С переводит в активную форму следующий фермент: Фактор В. Последний в ряду ферментов, профермент, и его активная форма: свертывающий фермент. Свертывающий фермент перерабатывает субстрат: коагулоген. Молекула коагулогена разрезается на несколько полипептидных цепей, между которыми затем образуются связи, в результате чего получается пространственная структура геля.

Ферменты, составляющие систему свертывания мечехвостов, являются сериновыми протеазами, очень похожими на факторы свертывания крови у млекопитающих. То же самое можно сказать и о субстрате, не случайно название коагулоген сходно с названием белка субстрата в системе коагуляции млекопитающих: фибриногеном.

Для активации ферментной системы, точнее первого фермента в каскаде, Фактора С, нужны минимальные концентрации бактериальных эндотоксинов.



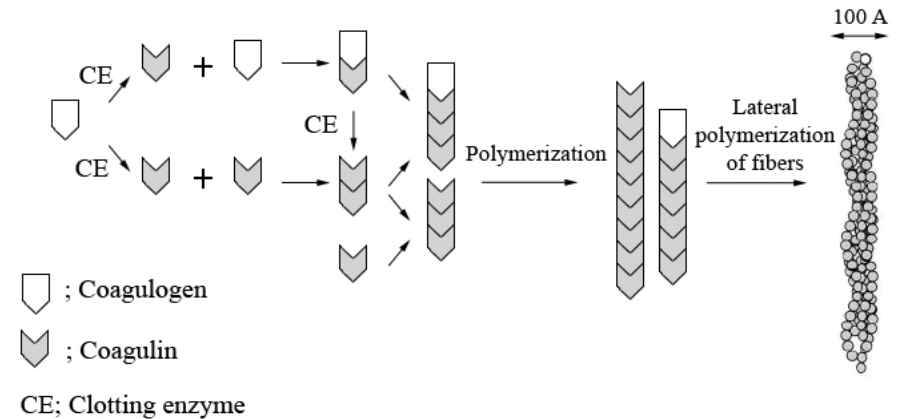
Система коагуляции мечехвоста

В основе всех методов оценки концентрации эндотоксинов лежит измерение степени активации ферментной системы, хотя способы измерения её активности могут быть различными. Концентрация эндотоксина может быть определена путем оценки количества переработанного субстрата (естественного или искусственного) за определенный промежуток времени: анализы по конечной точке. Она

также может быть определена путем оценки времени, необходимого для переработки определенного количества субстрата (точнее по определению скорости этой переработки): кинетические анализы.

В естественной ситуации свертывающий фермент разрезает коагулоген на несколько фрагментов, которые затем полимеризуются. В результате реакции с прозрачной реакционной смесью происходят изменения, которые выражаются в помутнении содержимого, образовании вязких гелевых масс и, в конце концов, в образовании твердого геля. Гель, образующийся в результате реакции, удерживается в виде плотного опалесцентного сгустка на дне пробирки при ее переворачивании на 180°. Такой наиболее простой способ оценки активности ферментной системы называется **гель-тромб тест**.

Процессу образования геля предшествует процесс полимеризации субъединиц коагулина, который сопровождается помутнением реакционной смеси. Степень этого помутнения может быть измерена фотометрически. Чем выше концентрация эндотоксина, тем активнее ферментная система, тем меньше надо времени для переработки субстрата, тем быстрее идет реакция. Метод, в котором результат реакции определяется по степени этого помутнения, называется **турбидиметрическим тестом**.



Пожалуй, наиболее интересным способом измерения активности ферментной системы является **хромогенный тест**. Для проведения этого анализа используется специальный ЛАЛ-реактив, в котором коагулоген заменен на искусственный хромогенный субстрат. Хромогенный субстрат представляет собой простой полипептид с хромофором на конце. Последовательность аминокислотных остатков в полипептиде аналогична аминокислотной последовательности коагулогена, предшествующей связи, разрезаемой свертывающим ферментом. Активный свертывающий фермент отрезает хромофор от пептидной цепи, и в растворе развивается желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна активности свертывающего фермента, которая в свою очередь определяется количеством эндотоксина в растворе. Интенсивность окраски также измеряется фотометрически.

Кинетические методы позволяют проводить точное количественное определение концентрации эндотоксина в растворе. Они позволяют во многом стандартизировать и автоматизировать процесс проведения реакции. Важным считается и тот факт, что автоматическая обработка и хранение результатов снижают риск получения ошибки, связанной с человеческим фактором.

© 2012. НПО «ЛАЛ-ЦЕНТР» г. Москва

Тел.: +7(925) 517-40-37,

Тел/факс: +7(495) 223-07-29,

E-mail: lalnews@limulustest.ru

Создание сайта : Мейкус-Сервис.